

PCT/JPC3/16641

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

24.12.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年12月27日

REC'D 19 FEB 2004

WIPO

PCT

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-379869

[ST. 10/C]: [JP2002-379869]

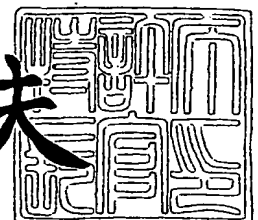
出 願 人
Applicant(s): 関西ティール・エル・オー株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3006419

【書類名】 特許願
【整理番号】 P02Z000351
【提出日】 平成14年12月27日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明の名称】 多層観察型光学顕微鏡及び多層観察ユニット
【請求項の数】 7
【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市北区西賀茂上庄田町 5 - 3 8

【氏名】 高松 哲郎

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市駅前 1 - 2 - 2 2 カサベルデ 3 1 0 号室

【氏名】 藤田 克昌

【特許出願人】

【識別番号】 899000046

【氏名又は名称】 関西ティー・エル・オー株式会社

【代理人】

【識別番号】 100068032

【弁理士】

【氏名又は名称】 武石 靖彦

【電話番号】 (075)241-0880

【選任した代理人】

【識別番号】 100080333

【弁理士】

【氏名又は名称】 村田 紀子

【電話番号】 (075)241-0880

【選任した代理人】

【識別番号】 100110331

【弁理士】

【氏名又は名称】 ▲吉▼▲崎▼ 修司

【電話番号】 (075)241-0880

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 039273

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0200919

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 多層観察型光学顕微鏡及び多層観察ユニット

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 対物レンズに対し、そのレンズから被観察試料に入射すべき励起用光線を入射させる光軸中に、収束／視準化レンズ対を配置し、それらのレンズ間に透過光の位相を光軸横断面の所定範囲内で変化させるための位相変更手段を設けたことにより、対物レンズに入射する励起用光線の波面の位相に応じた深度において前記試料を合焦点励起するように構成したことを特徴とする多層観察型光学顕微鏡。

【請求項 2】 前記収束／視準化レンズ対を配置する光軸が、共焦点顕微鏡において、対物レンズを通して被観察試料に照射される励起用光線と、同試料から放射されて対物レンズを逆向きに通過した蛍光線との共通光軸であることを特徴とする請求項 1 に記載の多層観察型光学顕微鏡。

【請求項 3】 前記位相変更手段が段階的に光学的特性の異なる複数の位相板セグメントを配列し、各セグメントが順次光軸を横切るように設置された回転板からなることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の多層観察型光学顕微鏡。

【請求項 4】 前記位相変更手段が各位相板セグメントの要素をなす等方性透明膜の厚さを段階的に変化させたことにより、それらの光学的特性を異ならしめたことを特徴とする請求項 3 に記載の多層観察型光学顕微鏡。

【請求項 5】 前記位相変更手段が各位相板セグメントの要素をなす等方性透明膜の屈折率を段階的に変化させたことにより、それらの光学的特性を異ならしめたことを特徴とする請求項 3 に記載の多層観察型光学顕微鏡。

【請求項 6】 光学顕微鏡の試料台の二次元走査と前記位相変更手段の位相走査とを同期させることにより、被観察試料の三次元動態を観察できるようにしたことを特徴とする請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の多層観察型光学顕微鏡。

【請求項 7】 段階的に光学的特性の異なる複数の位相板セグメントを円周方向に順次隣接するように配列した回転板からなり、対物レンズへの入射光軸中に配置された収束／視準化レンズ対における両レンズ間に挿入することにより、前記位相板セグメントの各々が順次両レンズ間の光軸を横切る際に、各セグメントご

とに透過光の位相を光軸横断面の所定範囲内において、異なった度合いで変化させるべき位相変更手段として作用する多層観察ユニットであって、このユニットを経て対物レンズに入射する光線の波面の位相に応じて、その焦点深度を変更させるものであることを特徴とする多層観察ユニット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は光学顕微鏡、特にリアルタイムにおいて三次元的に被観察試料の動態を観察することが可能な多層観察型光学顕微鏡、及びこれらの顕微鏡に使用可能な多層観察ユニットに関するものである。

【0002】

【従来の技術】

顕微鏡一般は焦点整合により被観察試料面の深さに対応するものであり、特に共焦点顕微鏡は光軸方向に優れた分解能をもち、三次元構造を有する標本の光学的切片像を観察できるため、医学及び生物学の分野において近年急速に普及した光学的観察手段である。その原理的構成は、図5に示すように、レーザー光源1から出たレーザービームを、例えば、二重回転板2（後に詳述する）におけるレンズアレイディスク9のマイクロレンズで収束し、ダイクロイックミラー11を透過させて、もう一方の回転板であるニポウディスク10のピンホール中に合焦・出射し、更に対物レンズ14を介して被観察体に照射し、それにより励起発光した蛍光を折り返し経路に乗せ、同一のピンホールを通して（所謂、共焦点で）計測するものである。

【0003】

この計測はピンホール通過後の蛍光を、ダイクロイックミラー11で反射し、凸レンズ12で収束させて高速CCDカメラ3に入射させることにより行われる。このような共焦点顕微鏡により生態組織を観察する場合、被観察体がマウス等であれば、その摘出心20等をカニユーレ21を用いて灌流し、心電図計測装置22でモニターしながら被観察部位にレーザービームを照射して行うことも、ある程度は効果的に実施される。

【0004】

しかしながら、共焦点顕微鏡はその光軸方向の高分解能性の故に、生きた細胞や組織の三次元像をリアルタイムで捕らえるには、深さの異なるレベルを多層的に観察する必要がある、これまでは標本ステージや対物レンズといった重量のあるものを動かさなければ成らなかったため（例えば、特許文献1、及び非特許文献1参照）、リアルタイムでの三次元観察は不可能であった。

【0005】

【特許文献1】

特開平06-341955号公報（[0009] 段末尾部分）

【0006】

【非特許文献1】

オリンパス光学工業（株）カタログ、「走査型レーザ顕微鏡」2002年9月30日検索、インターネットURL:<http://www.nagano-it.go.jp/seimitu/setubi/se-shuusekil0/se-04laser.html>（仕様の欄）

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の基本目的は、上記のような従来の共焦点レーザ顕微鏡を含む光学顕微鏡システムにおける三次元走査の困難性を光学的に解決した光学系構造を提供することにある。

【0008】

本発明の更なる目的は、生きた組織細胞の三次元的な動態をも高速に蛍光顕微鏡観察できる光学系構造を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

上記の目的を達成するための、第1の発明は、対物レンズに対し、そのレンズから被観察試料に入射すべき励起用光線を入射させる光軸中に、収束／視準化レンズ対を配置し、それらのレンズ間に透過光の位相を光軸横断面の所定範囲内で変化させるための位相変更手段を設けたことにより、対物レンズに入射する励起用光線の波面の位相に応じた深度において前記試料を合焦点励起するようにした光

学顕微鏡を構成したものである。

【0010】

上記の基本構成によれば、位相変更手段を経て視準化レンズを出た励起用光線の波面は、視準化レンズに向かう位相変更手段の状態ごとに、光軸からその光軸を横断する面内における周辺にかけて生ずる位相変位の度合が相違し、その位相変位度が大きければ、更に対物レンズに入射して結ばれる焦点の深度がそれに応じて深くなる。この深度変化の幅は、励起用光線の波長に応じて広くできるが、本発明では可視波長域で100 μ m程度まで可能である（使用する対物レンズのN A，倍率に依存する）。

【0011】

更に、上記の目的を達成するための、第2の発明は、前記収束／視準化レンズ対を配置する光軸が、共焦点顕微鏡において、対物レンズを通して被観察試料に照射される励起用光線と、同試料から放射されて対物レンズを逆向きに通過した蛍光線との共通光軸からなるように構成したものであり、上記第1の発明の技術的効果は、この共焦点顕微鏡において最もよく発揮される。

【0012】

更に、上記の目的を達成するための、第3の発明は、上記の基本構成における位相変更手段が、段階的に光学的特性の異なる複数の位相板セグメントを配列し、各セグメントが順次光軸を横切るように設置された回転板からなるようにしたものである。

【0013】

第4の発明によれば、この回転板からなる位相変更手段は、各位相板セグメントの要素をなす等方性透明膜の厚さを段階的に変化させたことにより、それらの光学的特性を異ならしめることができる。

【0014】

更に、第5の発明によれば、この回転板からなる位相変更手段は、各位相板セグメントの要素をなす等方性透明膜の屈折率を段階的に変化させたことにより、それらの光学的特性を異ならしめることができる。

【0015】

前述した更なる目的を達成するための、第6の発明は、本発明を適用する光学顕微鏡の試料台の二次元走査と、前記位相変更手段の位相走査とを同期させることにより、被観察試料の3次元動態を観察できるようにしたものである。これにより、蛍光観察光路の終端に配置されたCCDカメラ、例えば、既存の撮像速度1000フレーム/秒の、インテンシファイド高速CCDカメラ等によれば、生きた組織の3次元的動態などをも、高速に観察することが可能となる。

【0016】

更に、第7の発明は、光路長変化によらない対物レンズの焦点深度調整を可能にする基本的構成として、段階的に光学的特性の異なる複数の位相板セグメントを円周方向に順次隣接するように配列した回転板からなり、対物レンズへの入射光軸中に配置された収束／視準化レンズ対における両レンズ間に挿入することにより、前記位相板セグメントの各々が順次両レンズ間の光軸を横切る際に、各セグメントごとに透過光の位相を光軸横断面の所定範囲内において、異なった度合いで変化させるべき位相変更手段として作用する多層観察ユニットであって、このユニットを経て対物レンズに入射する光線の波面の位相に応じて、その焦点深度を変更させるようにした多層観察ユニットを提供するものである。

【0017】

【発明の実施の形態】

本発明は、細胞組織等の3次元動態の高速観察を可能とする多層観察ユニットを構成したものである。顕微鏡全体の構成としては、すでに実用化されている2次元(x-y)平面を高速に観察する顕微鏡と、それに使用する光源(レーザー)との間に、前記多層観察ユニット(観察深さ: z方向を多層的に変えて観察するユニット)を構成する位相変更手段としての光学位相板配列ディスクを挿入する形をとる。このユニットは順次異なった光学特性をもつ光学位相板のセグメント(円弧状片)をディスク状に配列構成し、回転することにより各セグメントが順次光軸を横切るように設置され、かくして高速に観察深さを変更し、各深さ(層)における2次元スライス像を得て組織細胞の3次元画像を構築・再現することができる。

【0018】

適用可能な光学顕微鏡としては、共焦点顕微鏡のほか一般的な蛍光顕微鏡や二光子顕微鏡、その他对物レンズを用いて被観察試料に光照射する光学顕微鏡を用いることができ、以下の好ましい実施例においては最も効果的な共焦点顕微鏡について説明する。

【0019】

【実施例】

本発明の多層観察型リアルタイム共焦点顕微鏡の好ましい実施例は、図1に示すとおりである。図1の光学系において、1はレーザー光源、2は二重回転円板式高速共焦点スキャナー、3はインテンシファイド高速CCDカメラ、4は高速共焦点スキャナー2のピンホールを出たレーザー光をコリメート、すなわち視準化する凸レンズ、5は収束レンズ、6は収束レンズ5から出て反転像化したレーザー光を視準化する第2の凸レンズであり、このレンズ5, 6間に本発明の多層観察ユニット7を構成する位相変更手段としての光学位相板の配列ディスクが配置される。レンズ6から出た視準レーザー光は蛍光位相差顕微鏡ユニット8に入射するようになっている。

【0020】

高速共焦点スキャナー2は、レーザー光源1側にマイクロレンズアレイディスク9を、コリメートレンズ4側に多数のピンホールが渦巻き状に配置された所謂ニポウディスク10を同軸・対向的に設置したものであり（図5参照）、当然ながらディスク9のマイクロレンズアレイも、ピンホールアレイに対応した渦巻き状であり、両ディスク9, 10の高速回転により、例えば、最速で1000フレーム/秒で光軸をx-y走査することができる。

【0021】

両ディスク9, 10間には励起用レーザー光を透過し、観察試料から返ってきた蛍光を反射するダイクロイックミラー11が配置され、その蛍光反射光路中には凸レンズ12が配置され、CCDカメラ3の受光面に結像するようになっている。CCDカメラ3は高速共焦点スキャナー2に対応して最速で1000フレーム/秒で光軸をx-y走査画像を撮影することができる。

【0022】

本発明の多層観察ユニット7は、図1の光学系内においては駆動用モーター13と共に、側面でのみ示しているが、その具体的構成例としては、図の上方に取出して斜視図で示すように、光学特性の異なる複数の位相板セグメントa、b、c、・・・をディスク状に配列したものである。光学特性がセグメントごとに段階的に異なる態様としては、各位相板セグメントの要素をなす等方性透明膜（当該斜視図においては区分図示していない）が同一膜物質から成る場合において、斜視図で拡大して示すように、その厚さを段階的に変化させるか、厚さは不変にして屈折率を段階的に変えるか、あるいはその両方の組み合わせを採用する。

【0023】

多層観察ユニット7を通り、視準化レンズ6から出たレーザービームは、蛍光位相差顕微鏡ユニット8内の対物レンズ14に入射し、可変の深度において、ここでは模式的に示した通り、シャーレ等に収容された細胞・組織試料15内に焦点を結ぶようになっている。また、この場合は光学系構成の便宜上、顕微鏡ユニット8内には、対物レンズ14の前に平面ミラーからなる光路折り曲げ鏡16が配置される（図1参照）。

【0024】

図2は、上述の光路折り曲げ鏡16を省略して、収束／視準化レンズ対5，6間に配置された多層観察ユニット7の位相板により、対物レンズ14により結ばれる焦点が効果的に深度調整される手順を示す模式図である。ここに（a）は、多層観察ユニット7の光路中セグメントの位相板要素が最も薄いものであるとき、（b）、（c）は順次それより厚くなった場合であり、レンズ5，6間の基準中間結像面と各中間レベルを整合させて描いたものである。

【0025】

図2（a）では、位相板要素が薄いため、収束レンズ5の周縁部から出て位相板要素7（a）内に入り、光軸と交差してから同要素7（a）を出るまでの距離が比較的短くなり（したがって光軸通過部との距離差も短くなり）、その部分と光軸出射部との位相差（前者の位相遅れ）は比較的小さい。したがって、これらの光波が対物レンズ14により合焦するレベルは、試料15内の最上位Z1となる。

【0026】

図2 (b) では、位相板要素が (a) より少し厚いため、収束レンズ5の周縁部から出て位相板要素7 (b) 内に入り、光軸と交差してから同要素7 (b) を出るまでの距離がやや長くなり（したがって光軸通過部との距離差もやや長くなり）、その部分と光軸出射部との位相差（前者の位相遅れ）もやや長くなる。したがって、これらの光波が対物レンズ14により合焦するレベルは、試料15内の次のレベル（ここでは中間位）Z2となる。

【0027】

図2 (c) では、位相板要素が (b) より更に厚いため、収束レンズ5の周縁部から出て位相板要素7 (c) 内に入り、光軸と交差してから同要素7 (c) を出るまでの距離が更に長くなり（したがって光軸通過部との距離差も更に長くなり）、その部分と光軸出射部との位相差（前者の位相遅れ）も更に長くなる。したがって、これらの光波が対物レンズ14により合焦するレベルは、試料15内の更に次のレベル（ここでは最下位）Z3となる。

【0028】

以上のことから、本発明の実施例においては、多層観察ユニット7の位相板要素がセグメントa、b、c、・・・と変位するごとに厚くなるため、対物レンズ14の対物面における光軸点から周縁部にかけて出射する波面の合焦点の深度は、効果的に十分な距離を変位することが理解できるであろう。また、この深度変位は、前述の実施例のごとく、多層観察ユニット7における各位相板セグメント要素（等方性透明膜）の厚さが段階的に変化する場合は、厚さは不変にして屈折率を段階的に変える場合、あるいはその両方の組み合わせを採用する場合にも生ずることは明らかである。

【0029】

図3は、本発明の高速共焦点顕微鏡により観察深度を順次変更しながら、光学断層像を計測し、これらを合成する画像処理により、リアルタイム3次元像を得る手順原理を示す模式図である。図3 (a) では、図2 (a) の位相板セグメント要素により確立した焦点レベルZ1において観察試料を2次元走査し、図3 (b) では、図2 (b) の位相板セグメント要素により確立した焦点レベルZ2にお

いて観察試料を2次元走査し、更に図3 (C) では、図2 (C) の位相板セグメント要素により確立した焦点レベルZ3において観察試料を2次元走査したものである。

【0030】

各レベルにおいて描いた複数の線18は、図1に示した高速共焦点スキャナー2の二重板9、10におけるマイクロレンズ／ピンホールアレイの本数に応じて形成される走査線であり、19はその走査線上においてレーザービーム17が結ぶ焦点である。かくして、これらの合焦点レーザービームによりその試料点から励起・発光した蛍光のうち、往路のレーザービームと同様の経路を逆にたどる蛍光が、多層観察ユニット7により、同じく波面位相を調整され、高速共焦点スキャナー2のニポウディスク10における光軸位置のピンホールを通り、ダイクロイックミラー11によって反射され、凸レンズ12を通過して高速CCDカメラ3により受光及び撮像処理されることは前述した通りである。

【0031】

実施例において、図3 (a) ～ (c) の過程は、好ましくは1/30秒程度で行われ、高速CCDカメラ3で画像取得後3次元像として合成される。例えば、1秒間1000フレームの高速CCDカメラを用いて3層の3次元観察を行う場合、1秒間に $1000 / 3 = 333.3$ の立体像が得られる。

【0032】

図4は、生体の左心室23及び左冠状動脈組織における心筋梗塞巣24の細胞を、本発明のリアルタイム共焦点顕微鏡によりリアルタイムで観察するため、カテテル等、何らかの方法でレーザー励起した場合の模式図である。共焦点顕微鏡のレーザー光路先端（対物レンズ）25から出たレーザービーム17は前述の態様にしたがって多層的に2次元走査され、この領域24の細胞が3次元画像によりリアルタイムで観察され、例えば、壊疽を生じていること等が容易に発見できるようになる。なお、26は心房、27は大動脈である。

【0033】

【発明の効果】

以上述べたとおり、本発明の多層観察型リアルタイム光学顕微鏡、特に共焦点顕

微鏡によれば、細胞や生体組織の3次元構造を、そのままの状態で高精度に観察することができる。すなわち、多層的に観察できない従来の方法では、本来3次元的な生体組織の営みを、シャーレ内での細胞培養等により2次元平面に置き換えることで可視化しているに過ぎず、生体の自然な姿を捉えているとは言いがたいものであったのに対し、本発明では、生体の営みを高速且つ立体的に可視化したものだからである。

【0034】

上記のような本発明の技術的効果は、その観察結果から、これまでは見えなかった多くの情報をもたらすであろう。それはまた医学・生物学、並びに関連諸分野において、きわめて有用であるものと期待される。

【0035】

更に、本発明のリアルタイム光学顕微鏡の製作に当たっては、従来の光学顕微鏡の対物レンズ直前光路中に、前述した多層観察ユニットを挿入するだけでよいため、比較的低コストで実施可能であり、その産業上の利点もまた極めて大きいものがある。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の多層観察型リアルタイム共焦点顕微鏡の好ましい実施例を示す光学系構成図である。

【図2】

図1の実施例の要部をなす多層観察ユニットの構成図であり、(a)、(b)、(c)の順に焦点深度が深まっていく態様を示している。

【図3】

実施例の多層観察型リアルタイム共焦点顕微鏡において、(a)最も浅いZ1レベル、(b)中間Z2レベル、(c)最も深いZ3レベルにおいて、順次に2次元走査(光学断層像の撮影)を行い、3次元像を合成する手順を示す模式図である。

【図4】

本発明の多層観察型リアルタイム共焦点顕微鏡により、実際の生体組織を観察す

る状態を示す模式図である。

【図 5】

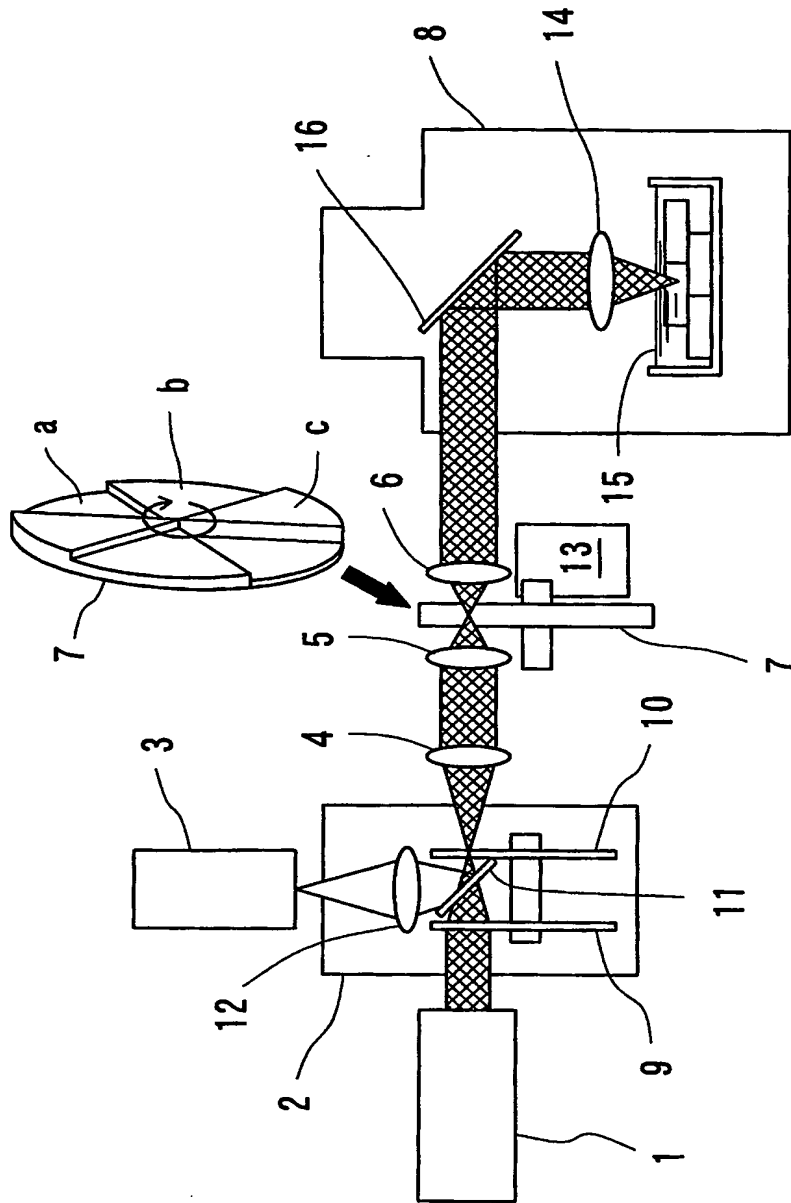
従来の共焦点顕微鏡により、ラットの心臓組織を観察する状態を示す略図である。

【符号の説明】

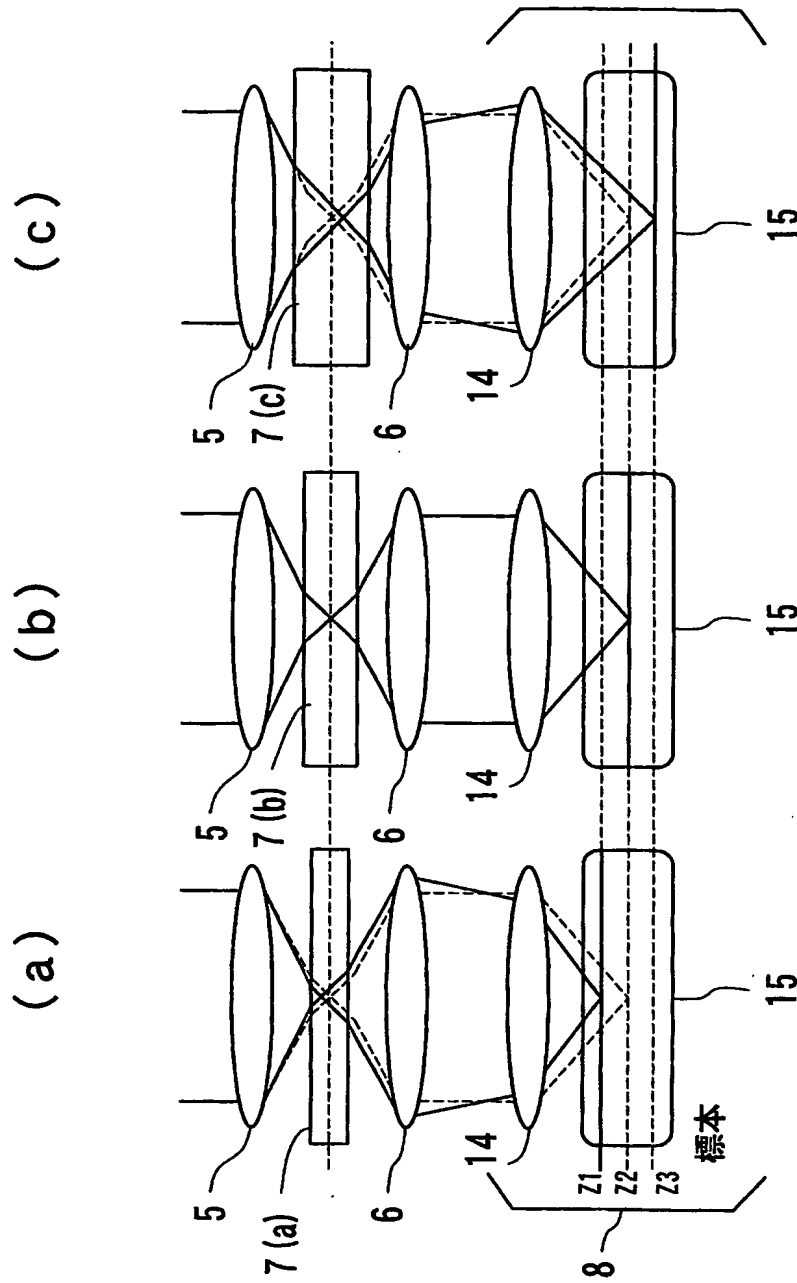
- 1 レーザー光源
- 2 二重回転円板式高速共焦点スキャナー
- 3 高速 CCD カメラ
- 4、6 視準化レンズ
- 5 収束レンズ
- 7 多層観察ユニット（位相変更手段）
- 8 蛍光位相差顕微鏡ユニット
- 9 マイクロレンズアレーディスク
- 10 ニポウディスク
- 11 ダイクロイックミラー
- 12 凸レンズ
- 13 駆動用モーター
- 14 対物レンズ
- 15 細胞・組織試料
- 16 光路折り曲げ鏡
- 17 レーザービーム
- 18 走査線
- 19 焦点

【書類名】 図面

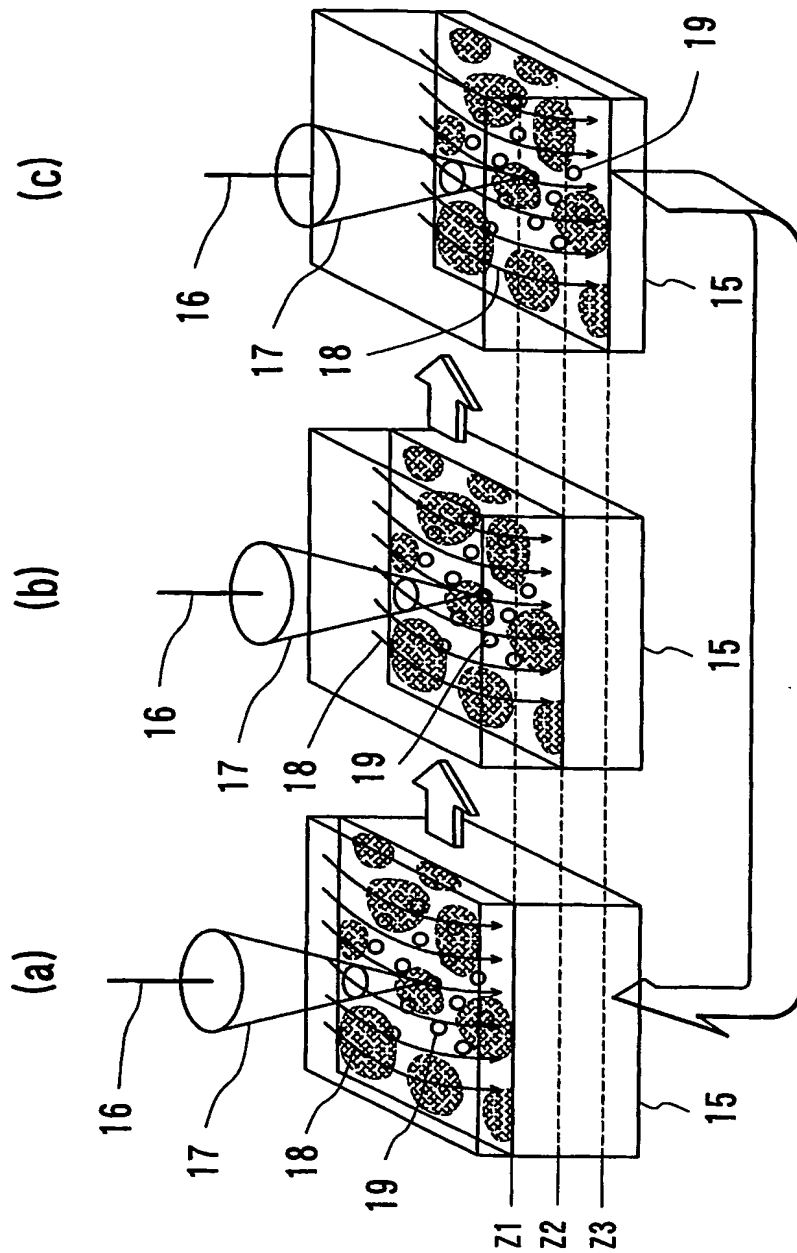
【図1】



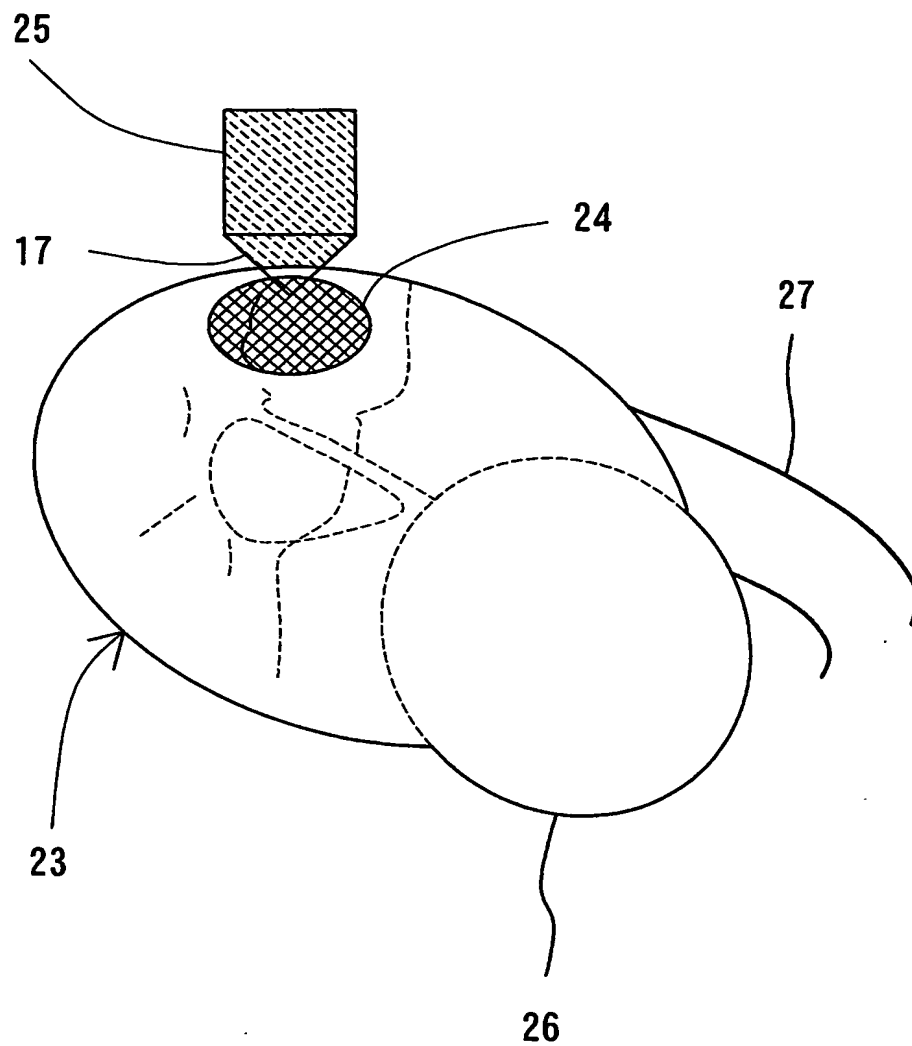
【図 2】



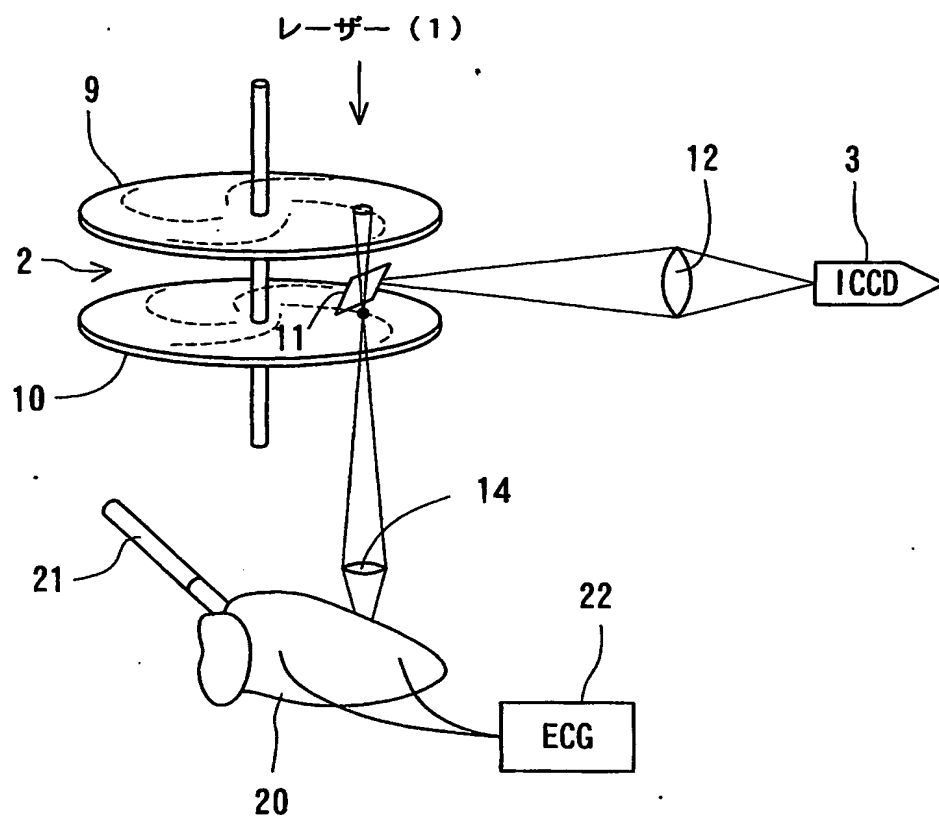
【図3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 多層観察型リアルタイム光学顕微鏡を構成しようとする。

【解決手段】 光学顕微鏡において、対物レンズ14を通して被観察試料15に照射される励起用光線と、同試料から放射されて対物レンズを逆向きに通過した蛍光線との共通光軸中に、収束／視準化レンズ対5, 6を配置し、それらのレンズ間に透過光の位相を所定の範囲内で変化させるための位相変更手段7を設けたことにより、対物レンズに入射する励起用光線の波面の位相に応じた深度において前記試料を合焦点励起するように構成したものである。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 2 - 3 7 9 8 6 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[8 9 9 0 0 0 0 4 6]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 8 月 2 日

[変更理由]

住所変更

住 所

京都府京都市下京区中堂寺栗田町 9 3 番地

氏 名

関西ティー・エル・オー株式会社